

Andreas Eschelbach

Dr. med.

Regulation der Genexpression in Phäochromozytom (PC12)-Zellen durch vasoaktives intestinales Peptid und Nervenwachstumsfaktor

Geboren am 02.08.1972 in Heidelberg

Reifeprüfung am 18.05.1992 in Sandhausen

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1994 bis WS 2000/2001

Physikum am 21.03.1996 an der Universität Heidelberg

Praktisches Jahr in Schwetzingen

Staatsexamen am 23.10.2000 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Anatomie

Doktorvater: Univ. Prof. Dr. med. L. Klimaschewski

Die neurotrophen Faktoren vasoaktives intestinales Peptid (VIP) und Nervenwachstumsfaktor (NGF) induzieren in Phäochromozytomzellen (PC12) die Expression von Genen, die an der neuronalen Differenzierung der Zelle beteiligt sind. Basierend auf den Änderungen der Genexpression bilden PC12-Zellen nach Applikation beider Wachstumsfaktoren konsekutiv einen neuronalen Phänotyp aus. Dabei unterhält VIP transient das Wachstum weniger langer, geringgradig verzweigter Fortsätze, während NGF-behandelte PC12-Zellen multiple kurze, sehr stark verzweigte Fortsätze besitzen.

In Anbetracht der unterschiedlichen morphologischen Phänotypen wurde die Regulation der Genexpression in der Frühphase der neuronalen Differenzierung durch VIP und NGF in PC12-Zellen untersucht, um Unterschiede in der mRNA-Synthese zwischen den neurotrophen Faktoren aufzuzeigen. Dabei standen besonders Gene im Mittelpunkt des Interesses, deren Expression und Regulation die morphologische Differenzierung der PC12-Zelle einleiten. Mittels Differential Display PCR-Technik wurden insgesamt 15 mRNAs untersucht, die als Zielgene der durch VIP und NGF ausgelösten intrazellulären Signaltransduktionswege in Frage kommen. Die unterschiedliche Expression der untersuchten mRNAs gegenüber Kontrollzellen wurde mittels RT-PCR und Southern Hybridisierung mit anschließender densitometrischer Auswertung bestätigt.

Unter den 15 differentiell exprimierten Genen finden sich dabei acht mRNAs (53%), deren Vorkommen bereits in PC12-Zellen beschrieben wurde. Für vier mRNAs konnte die Änderung der Genexpression nach NGF-Behandlung durch Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen bestätigt werden. Dabei wurde die EST105223 mRNA nach einstündiger Behandlung mit NGF in PC12-Zellen vermehrt exprimiert, während in der Literatur von einer verminderten Expression nach mehrtägiger NGF-Behandlung berichtet wird. Drei weitere mRNAs (20%) wurden identifiziert, deren Expression und Regulation in PC12-Zellen weder für vasoaktives intestinales Peptid noch für Nervenwachstumsfaktor beschrieben sind. Bei den restlichen vier mRNAs (27%) handelt es sich höchstwahrscheinlich um neue Gene, die in PC12-Zellen exprimiert werden und möglicherweise an der neuronalen Differenzierung der Zelle beteiligt sind.

Die Mehrheit der untersuchten mRNAs (74%) wurde in VIP- und NGF-behandelten PC12-Zellen einheitlich reguliert. Demnach induzieren beide Wachstumsfaktoren in der Frühphase der neuronalen Differenzierung identische Gene. Dies legt die Vermutung nahe, daß diese mRNAs über einen gemeinsamen intrazellulären Signaltransduktionsweg (Ras-Raf-MAP Kinase) reguliert werden.

Ähnlich der Mehrheit der differentiell exprimierten mRNAs wird der PACAP type I Rezeptor in PC12-Zellen nach Applikation beider Neuropeptide einheitlich reguliert. Während in der Literatur von einem Anstieg der Rezeptor-mRNA 24 Stunden nach Applikation der Wachstumsfaktoren VIP und NGF berichtet wird, ergeben eigene Untersuchungen demgegenüber, daß die Expression des Rezeptor-Gens bereits in der Frühphase der neuronalen Differenzierung auf mRNA-Ebene induziert wird.

Inwieweit die molekularen Mechanismen der neuronalen Differenzierung in PC12-Zellen mit den Veränderungen der Genexpression im Zuge der axonalen Regeneration übereinstimmen, wurde an sympathischen Ganglien (SCG) *in-vivo* nach peripherer Nervenläsion überprüft, zumal chromaffine Zellen und sympathische Neurone von gemeinsamen sympathoadrenalen Vorläuferzellen abstammen. Da 13 der 15 untersuchten mRNAs (87%) in beiden Modellen einheitlich und nur 2 mRNAs (13%) unterschiedlich reguliert wurden, ist anzunehmen, daß die meisten mRNAs, die an der neuronalen Differenzierung der PC12-Zelle beteiligt sind, möglicherweise ähnliche Aufgaben und Funktionen im Rahmen der Regeneration axotomierter sympathischer Neurone erfüllen. Darüberhinaus ist in sympathischen Neuronen der Ganglien lediglich die Induktion der Non-muscle myosin light chain mRNA bekannt. In allen anderen Fällen werden erstmalig die Expression und Regulation der mRNAs im

Ganglion cervicale superius der Ratte nach Axotomie untersucht und deren mögliche *in-vivo* Relevanz im Rahmen der Regeneration sympathischer Neurone diskutiert.